

Aus der medizinischen Poliklinik der Universität Basel

(Direktor: Prof. Dr. O. Gsell)

Arbeit unter Leitung von P. D. Dr. P. Miescher

Experimenteller Beitrag
zur Pathogenese der allergischen medikamentösen
Agranulozytose und Thrombopenie

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät
der Universität Basel

vorgelegt von

STANLEY C. PEARL

von Nyack, New York, U.S.A.

Von der Medizinischen Fakultät genehmigt
auf Antrag von Prof. Dr. O. Gsell
Tag der Promotion: 28. November 1957

Erschienen in der Zeitschrift: Blut, vol. IV, Heft 2, 1958.

Aus der medizinischen Poliklinik der Universität Basel (Direktor: Prof. Dr. O. Gsell)

Experimenteller Beitrag zur Pathogenese der allergischen medikamentösen Agranulozytose und Thrombopenie*

Von A. Pearl

Auf Grund der serologischen Forschung der letzten 10 Jahre wissen wir heute, daß im Verlaufe von allergischen Thrombopenien und Agranulozytosen im Blut der damit befallenen Patienten spezifische Vorgänge sich abspielen. Diese wurden erstmals von *Ackroyd*¹⁻⁴ für den Fall der Sedormid-Purpura eingehend erforscht. Es konnte gezeigt werden, daß das Serum von Patienten, die gegenüber Sedormid überempfindlich sind, d. h. auf Sedormidgabe mit einer thrombopenischen Purpura reagieren, einen spezifischen Faktor enthält, der in Gegenwart von Sedormid normale Thrombozyten schädigt (verminderte Retraktion des Blutkuchens!) und zur Agglutination bringt. Analoge serologische Reaktionen wurden später von *Moeschlin* und *Wagner*²⁰ für den Fall der allergischen medikamentösen Agranulozytose beschrieben. Es lag hierbei lediglich der Unterschied vor, daß das untersuchte Medikament, nämlich Pyramidon, nicht in vitro dem Patientenserum zugegeben werden konnte, um eine Leukozyten-Agglutination zu erhalten, sondern daß es den Patienten peroral gegeben werden mußte, damit das Blut anschließend für Stunden bis wenige Tage die Fähigkeit erlangte, normale Leukozyten zu agglutinieren. Im Falle einer Sul-fapyridin-Agranulozytose waren die Seroreaktionen denjenigen bei der Sedormid-Thrombopenie noch ähnlicher, indem hier das Medikament in vitro dem Serum zugefügt normale Leukozyten agglutinierte²¹. Analoge Beobachtungen konnten seither von verschiedenen Autoren gemacht werden^{5, 6, 9, 13, 15}. Während die Tatsache dieser Seroreaktionen allgemein anerkannt wurde, gab deren Interpretation zu Diskussionen Anlaß. *Ackroyd* nahm an, daß wir es mit einem Sensibilisierungsvorgang des Organismus gegen ein komplexes Antigen zu tun haben, wobei die durch das Medikament alterierten, d. h. in der Antigenstruktur modifizierten Thrombozyten bzw. Leukozyten das Antigen darstellen würden. Andere Autoren^{13, 14} halten die Vorgänge an den Leukozyten und Thrombozyten für sekundäre Auswirkungen von Antigen-Antikörper-Reaktionen, ohne daß die betroffenen Zellen am eigentlichen immunologischen Vorgang unmittelbar, d. h. als Antigenbestandteil beteiligt wären. Als Stütze für diese Auffassung wird auf die Tatsache verwiesen, daß analoge Reaktionen auch mit bekannten Antigen-Antikörper-Systemen angestellt werden können, wenn auch mit schwächerer Auswirkung für Thrombozyten und Leukozyten¹⁵. Ob durch die Antigen-Antikörper-Reaktion mehr die Thrombozyten oder die

Eingegangen am 20. September 1957

*) Arbeit unter Leitung von Dr. P. Miescher



Leukozyten geschädigt werden, dürfte von den physikochemischen Auswirkungen der Antigen-Antikörper-Reaktion abhängig sein. Der Vorgang könnte mit der »passiven Hämagglutination« verglichen werden, bei welcher die Reaktion eines an der Oberfläche eines roten Blutkörperchen adsorbierten Antigens mit dem entsprechenden Antikörper zu einer Schädigung der als Antigenträger funktionierenden Zelle führt¹⁰.

Die Auffassung, daß die Seroreaktionen im Falle medikamentallergischer Thrombopenien und Leukopenien auf einem der passiven Hämagglutination analogen Prinzip beruhen, wurde bisher im Tierexperiment lediglich durch Sensibilisierungsversuche mit Proteinen als Antigen zu stützen versucht. Zur Klärung dieser Frage und als Ausgangspunkt für weitere Studien der beschriebenen Phänomene schien es wünschenswert, entsprechende immunologische Reaktionen mit chemisch einfachen Substanzen als Allergen anzustellen.

Wir haben in der vorliegenden Arbeit zwei Substanzen gewählt, die für einfache chemische Stoffe eine relativ starke Antigenizität besitzen: Arsphenamin* und Pikrylchlorid. *Arsphenamin* (Altsalvarsan) fand früher als Mittel der Wahl zur Behandlung syphilitischer Patienten ausgedehnte Verwendung. Dabei häuften sich Beobachtungen über unerwünschte Nebenwirkungen, die meist die Folge einer Sensibilisierung des Organismus gegenüber diesem Medikament zu sein schienen. Entsprechende Studien am Menschen und im Tierexperiment zeigten denn deutlich, daß es relativ leicht gelingt, den Organismus mit Arsphenamin zu sensibilisieren^{7, 11}. Deshalb wurde das Präparat schließlich aus dem Handel zurückgezogen und durch andere, weniger antigene Substanzen ersetzt. Unter den Nebenwirkungen durch Arsphenamin nahmen die Blutschäden die wichtigste Stelle ein¹⁰. Dabei kam es bald zu einer Thrombopenie, bald zu einer Agranulozytose und häufig auch zu einer Panmyelopathie. Auf Grund dieser Tatsachen schien also Arsphenamin für unseren Zweck geeignet.

Pikrylchlorid stellt eine Substanz dar, die keine therapeutische Anwendung gefunden hat, als differenter Körper aber immer wieder tierexperimentell für immunologische Studien herangezogen wurde. Seine Fähigkeit, Tiere zu sensibilisieren, ist also bekannt¹².

Je 5 Kaninchen wurden mit Arsphenamin und mit Pikrylchlorid sensibilisiert und die Seren dieser Tiere auf ihre Fähigkeit, Leukozyten oder Thrombozyten in Gegenwart dieser Substanzen zu agglutinieren, untersucht. Zum Vergleich wurden 5 Kaninchen mit Humanserum sensibilisiert und ihre Seren entsprechend mit Humanserum und Leukozyten bzw. Thrombozyten getestet. Ferner wurde das Serum der Tiere nach der nephelometrischen Versuchsanordnung von *Hoigné, Storck* und *Grossmann*⁸ mit Arsphenamin und Pikrylchlorid untersucht. *Hoigné* und Mitarbeiter beschrieben eine besondere Trübungsreaktion zum Allergennachweis bei medikamentallergischen Affektionen. Zu verdünntem Serum werden sukzessive fallende Allergenverdünnungen zugegeben. Die dadurch bedingte Aufhellung des Serums wird nephelometrisch gemessen. Im Falle einer positiven Reaktion kommt es zu keiner Trübungsverminderung

* Arsphenamin wurde von der »La Sintetica«, S. A., speziell für unsere Versuche hergestellt, wofür an dieser Stelle vielmals gedankt sei.

durch die Allergenverdünnung, d. h. es wird angenommen, daß eine leichte Trübung aufgetreten ist, die die Aufhellung durch die Allergenverdünnung aufhebt, woraus keine Trübungsänderung des Systems resultiert.

Methodik

Kaninchen mit einem Gewicht von 2 bis 3 kg wurden verwendet. 5 Tiere erhielten wöchentlich 4 mg Arsphenamin je Tier zusammen mit 2 cm³ Adjuvans nach Freund (Lanolin, Paraffinum subliquidum aa, 5 mg hitzegetöteter BCB-Bazillen/cm³) intramuskulär und intraperitoneal injiziert. Von der 8. Woche an bis zum 6. Monat wurde das Plasma der Tiere regelmäßig getestet. Blutentnahme durch Herzpunktion (1 cm³ 5%iges Sequestren-Na₂ + 9 cm³ Blut).

5 Kaninchen wurden wöchentlich mit 0,2 mg Pikrylchlorid je Tier zusammen mit *Freundschem* Adjuvans (wie oben) sensibilisiert. Blutentnahme wie bei der ersten Gruppe.

2 Kaninchen wurden wöchentlich mit 5 cm³ Humanserum und *Freundschem* Adjuvans behandelt. Weiteres Vorgehen wie bei 1. Gruppe.

Leukozyten-Agglutinationsmethode

a) Gewinnung von Leukozyten: Normalen Kaninchen wurden 300 cm³ einer sterilen, physiologischen Kochsalzlösung von 37° C in die Bauchhöhle injiziert. Die Kochsalzlösung enthielt 0,04‰ Merthiolat. Nach 4 Stunden wurde die Bauchhöhle mit einem Trokar punktiert. Die physiologische Kochsalzlösung enthielt dann gewöhnlich zahlreiche Leukozyten. Um die Bildung von Fibringerinnungen in der an Gerinnungsfaktoren reichen Bauchhöhlenflüssigkeit zu vermeiden, wurde diese in einem silikonierten Becher aufgefangen, welcher 5 cm³ einer 5%igen Na₂-Sequestren-Lösung enthielt. Durch diese Punktion wurden 100 bis 200 cm³ Flüssigkeit gewonnen. Die Beimischung von Erythrozyten war in der Regel gering, kleiner als 1% der Leukozyten. Die leukozytenreiche Flüssigkeit wurde anschließend sofort bei 1000 Touren/min. während 5 Minuten zentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit dekantiert und das Leukozyten-sediment mit 4 cm³ physiologischer Kochsalzlösung versetzt. Die Leukozyten wurden durch leichtes Schütteln in Suspension gebracht. Ein Teil blieb als kleine Klümpchen verklebt, welche schnell sedimentierten, worauf die homogene Leukozytensuspension leicht abpipettiert werden konnte. Nach mikroskopischer Kontrolle wurde die Leukozytensuspension durch Zusatz von physiologischer Kochsalzlösung auf die gewünschte Konzentration von 10 000 Leukozyten/mm³ gebracht. Nicht jedesmal waren die Leukozyten für den Versuch geeignet. Es wurden nur regelmäßig suspendierte Leukozyten, die nicht älter als 6 Stunden waren, verwendet.

b) Leukozyten-Agglutinationstest: Ein Tropfen der Leukozytensuspension (10 000/mm³ in physiologischer Kochsalzlösung) wurde mit einem Tropfen der Allergenverdünnung und einem Tropfen der Antiserumverdünnung gemischt und während 30 Minuten bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde ein Tropfen aus dem Gemisch entnommen und auf einem Objektträger mikroskopisch unter Verwendung des Phasenkontrast-Systems auf Leukozyten-Agglutination untersucht.

Thrombozyten-Agglutinationsmethode

a) Gewinnung von thrombozytenreichem Plasma: Kaninchenblut (1 cm³ Na₂-Sequestren + 9 cm³ Blut) wurde 3 Minuten bei 3000 Touren/min., anschließend 5 Minuten bei 1000 Touren/min. zentrifugiert. Das überstehende Plasma ist reich an Thrombozyten und wurde für die folgenden Versuche verwendet.

b) Thrombozyten-Agglutinationstest: 2 Tropfen des thrombozytenreichen Kaninchen-Immunplasma wurden mit 2 Tropfen der Allergenverdünnung gemischt und 60 Minuten bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde ein Tropfen entnommen und mikroskopisch untersucht.

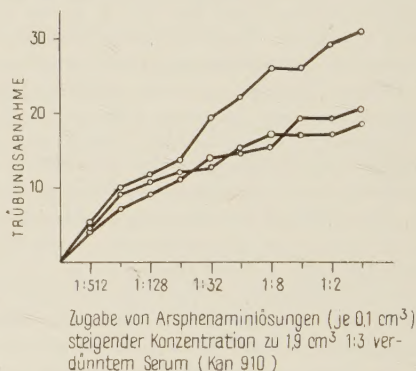
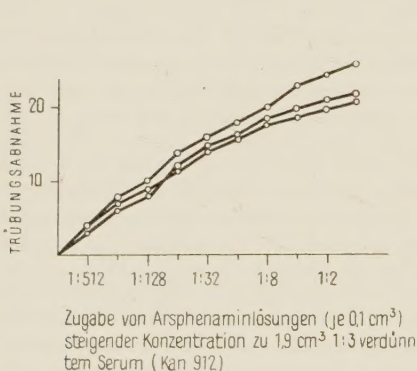
Nephelometrischer Test nach Hoigné, Storck und Grossmann⁸

Serum wurde im Verhältnis 1:3 mit destilliertem Wasser verdünnt. Mit dem Versuch wurde erst 60 Minuten später begonnen, da sich nur allmählich eine konstante Trübung im verdünnten Serum einstellt. 1,9 cm³ der Serumverdünnung wurden in eine Glasküvette gebracht. Die in einem rechten Winkel zum Einfallstrahl austretende Lichtstreuung wurde in einem nach den Angaben von Hoigné und Mitarbeitern konstruierten Nephelometer gemessen. Das

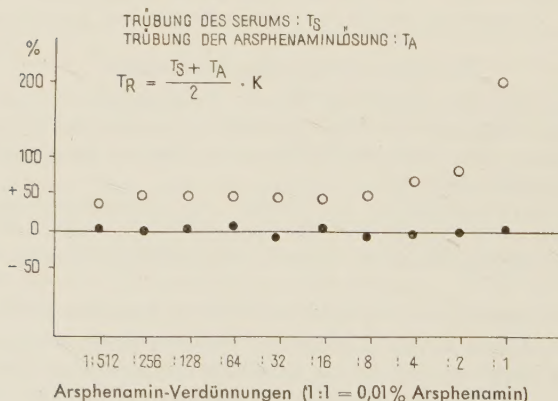
Meßsystem beruht auf dem Prinzip der Kompensationsschaltung. Das einfallende Licht wird mit dem gestreuten Licht durch 2 Selenzellen, die gegeneinandergeschaltet sind, verglichen. Nach Einführung der Ausgangslösung in den Apparat wird der Galvanometerausschlag auf 0 gebracht. Darauf werden stufenweise je $0,1 \text{ cm}^3$ einer üblichen Zweier-Verdünnungsreihe des Allergens mit der Ausgangslösung vermischt. Die Abnahme des gestreuten Lichtes wird elektrisch kompensiert. Die elektrische Trübungskompensation wird als Maß für die relative Trübungsänderung genommen. Mit Normalseren nimmt die Trübung kontinuierlich und regelmäßig ab. Im Falle einer »Sensibilisierung« erfolgt in einem bestimmten Verdünnungsbereich ein Knick in der Kurve, indem die Trübung zwischen zwei Verdünnungsstufen nicht mehr abnimmt, sondern gleichbleibt.

Ergebnisse

I. Arsphenaminreihe. (Tab. 1 u. 2; Abb. 1—3). Arsphenamin allein agglutiniert in hoher Konzentration Leukozyten ohne Zugabe von Kaninchenserum. In einer Konzentration von $0,01\%$ und mehr führt Arsphenamin zudem zu



% ABWEICHUNG DES TRÜBUNGSWERTES VON SERUM-
ARSPHENAMIN-LÖSUNGEN VOM ERRECHNETEN
TRÜBUNGSWERT T_R



○ SERUM VON KAN. 910 (1:10 VERDÜNNT)
● SERUM VON KAN. 912 (1:10 VERDÜNNT)

ganz feinen Präzipitationen, wenn es mit Plasma vermischt wird. Deshalb wurden für die folgenden Versuche höhere Verdünnungen verwendet. – Zusammen mit Plasma von unbehandelten Kaninchen führte Arsphenamin zu einer geringgradigen Agglutination von Leukozyten. Demgegenüber kam es mit dem Plasma des Tieres 910 zu einer heftigen Leukozytenagglutination, die noch bei stärkster Arsphenaminverdünnung nachweisbar war. Auch das Plasma 923 führte zu einer gegenüber den Kontrollen verstärkten Agglutination der Leukozyten. Der Unterschied zu den Kontrollen kam besonders deutlich bei einer Arsphenaminverdünnung von 1:16 in der Arsphenaminverdünnungsreihe, bzw. bei einer Plasmaverdünnung von 1:4 in der Plasmaverdünnungsreihe zum Ausdruck.

Tab. 1 a

Plasma Nr.	Arsphenamin- Verdünnung	Kaninchenplasma-Verdünnungen			
		1:1	1:4	1:16	1:256
910	1:4	++++	++++	++	++
	1:16	+++	++	+	+
912	1:4	++	(+)	(+)	++
	1:16	+	(+)	(+)	+
923	1:4	+++	++	+	++
	1:16	++	++	(+)	+
Kontrolle	1:4	++	+	(+)	++
	1:16	+	(+)	(+)	+

Tab. 1 b

Plasma Nr.	Arsphenamin-Verdünnungen						
	1:4	1:16	1:64	1:256	1:1024	1:4096	1:16000
910	++++	+++	+++	+++	++	++	+
912	++	+	+	(+)	—	—	—
914	++	+	(+)	(+)	—	—	—
916	++	+	(+)	(+)	—	—	—
923	+++	++	+	+	(+)	—	—
Kontrolle	++	+	+	(+)	(+)	—	—

Tab. 1: Einwirkung von (Kaninchenplasma + Arsphenamin) auf Kaninchenleukozyten mit dem Plasma von Kaninchen, die mit Arsphenamin sensibilisiert worden sind (910, 912, 914, 916, 923) und mit Plasma von unbehandelten Kaninchen (Kontrolle).

a) Kaninchenplasma-Verdünnungsreihe.

b) Arsphenamin-Verdünnungsreihe. (1:1 = 0,01% in physiologischer NaCl-Lösung).

Im thrombozytenreichen Plasma von 2 der 5 sensibilisierten Tiere (910 und 923) kam es durch Zusatz von Arsphenamin zu einer starken Agglutination der Thrombozyten.

Der *nephelometrische Test* gab mit dem Serum von 4 der sensibilisierten Tiere ein negatives Ergebnis, d. h. durch sukzessive Zugabe zu 1:3 verdünntem

Plasma Nr.	Arsphenamin-Verdünnungen						
	1 : 4	1 : 16	1 : 64	1 : 256	1 : 1024	1 : 4096	1 : 16000
910	++++	+++	++	+	(+)	—	—
912	(+)	(+)	—	—	—	—	—
914	+	(+)	(+)	—	—	—	—
916	(+)	(+)	(+)	—	—	—	—
923	++++	++	+	—	—	—	—
Kontrolle	(+)	(+)	—	—	—	—	—

Tab. 2: Einwirkung von Arsphenamin auf thrombozytenreiches Kaninchenplasma von Kaninchen, die mit Arsphenamin sensibilisiert worden sind (910, 912, 914, 916, 924) und mit Plasma von Kontrolltieren (Kontrolle). Arsphenamin 1:1 = 0,01% in physiologischer Kochsalzlösung.

Serum von Arsphenaminlösungen zunehmender Konzentration resultierte eine kontinuierliche Trübungsabnahme (Beispiel: Abb. 1, Plasma des Kaninchens 912): Einzig mit dem Serum Nr. 910 wurden Kurven erzielt, die als positiv bewertet werden können, und zwar in allen der 3 Versuche (Abb. 2). Wir haben darauf Trübungsmessungen in anderer Versuchsanordnung angestellt: Mit dem *Eppendorfschem* Photometer wurde der Einfluß von Arsphenamin auf die Trübung des Serums folgendermaßen gemessen: Mit je 1 cm³ mit physiologischer Kochsalzlösung 1:10 verdünntem Serum wurde 1 cm³ Arsphenamin verschiedener Konzentration vermischt. Arsphenamin wurde in H₂O gelöst und mit H₂O verdünnt. Die Trübung des Serums wurde in absoluten Werten gemessen (= T^S), ebenso die Trübung der Arsphenaminlösung (T^A). Mit einem Korrektionsfaktor k multipliziert sollte die Mischung dieser beiden Lösungen eine Trübung $T^R = \frac{T^S + T^A}{2} \cdot k$ geben. k wurde bestimmt, indem das 1:10

verdünnte Serum zu gleichen Teilen mit H₂O verdünnt wurde. Die resultierende Trübung wurde nach obiger Formel errechnet und mit dem gefundenen Trübungswert verglichen. Aus der Differenz wurde der korrigierende Faktor k für jedes Serum bestimmt (k = 1,05–1,5). Wir haben kurvenmäßig die prozentuale Abweichung des erhaltenen Trübungswertes vom errechneten Wert in Abb. 3 dargestellt. Daraus geht hervor, daß die mit dem Serum 910 erhaltenen Trübungswerte tatsächlich höher als die errechneten liegen, was auf eine positive Trübungsreaktion hinweist und so den positiven Ausfall der in der anderen Versuchsanordnung erhaltenen Kurven zu bestätigen scheint.

II. *Pikrylchloridreihe* (Tab. 3 u. 4). Von den 5 mit Pikrylchlorid sensibilisierten Kaninchen starb 1 Tier, bevor sein Plasma serologisch untersucht werden konnte. Das Plasma der übrigen 4 Tiere unterschied sich nicht von demjenigen unbehandelter Kaninchen und war in Gegenwart von Pikrylchlorid ohne besondere Wirkung auf Thrombozyten und Leukozyten. Auch die nephelometrische Untersuchung ergab bei dreimaliger Testung aller Seren ausnahmslos negative Ergebnisse.

Tab. 3 a

Plasma Nr.	Pikrylchlorid- Verdünnung	Kaninchenplasma-Verdünnungen				
		1 : 1	1 : 4	1 : 16	1 : 64	1 : 256
943	1 : 1	+	+	(+)	—	—
	1 : 4	+	+	(+)	—	—
971	1 : 1	++	++	+	(+)	—
	1 : 4	++	+	(+)	—	—
995	1 : 1	++	+	(+)	—	—
	1 : 4	+	+	(+)	(+)	—
998	1 : 1	++	+	(+)	(+)	—
	1 : 4	++	+	(+)	—	—
Kontrolle	1 : 1	++	+	+	(+)	—
	1 : 4	++	+	(+)	(+)	—

Tab. 3 b

Plasma Nr.	Pikrylchlorid-Verdünnungen							
	1 : 1	1 : 4	1 : 16	1 : 64	1 : 256	1 : 1024	1 : 4096	1 : 16 000
943	+	+	+	(+)	(+)	—	—	—
971	++	++	+	+	(+)	(+)	—	—
995	+	+	+	(+)	(+)	—	—	—
998	++	+	+	(+)	(+)	(+)	—	—
Kontrolle	++	+	+	(+)	(+)	(+)	—	—

Tab. 3: Einwirkung von (Kaninchenplasma + Pikrylchlorid) auf Kaninchenleukozyten mit dem Plasma von Kaninchen, die mit Pikrylchlorid sensibilisiert worden sind (943, 971, 995, 998) und mit Plasma von unbehandelten Kaninchen (Kontrolle).

- a) Kaninchenplasma-Verdünnungsreihe.
- b) Pikrylchlorid-Verdünnungsreihe (1:1 = gesättigte Lösung in physiologischer NaCl-Lösung).

Plasma Nr.	Pikrylchlorid-Verdünnungen			
	1 : 1	1 : 4	1 : 16	1 : 128
943	—	—	—	—
971	—	—	—	—
995	—	—	—	—
998	—	—	—	—
Kontrolle	—	—	—	—

Tab. 4: Einwirkung von Pikrylchlorid auf thrombozytenreiches Kaninchenplasma von Kaninchen, die mit Pikrylchlorid sensibilisiert worden sind (943, 971, 995, 998) und mit Plasma von Kontrolltieren (Kontrolle). Pikrylchlorid 1:1 = gesättigte Lösung in physiologischer NaCl-Lösung.

III. *Humanserum* (Tab. 5. u 6). Humanserum ohne Zusatz von normalem Kaninchenserum führt zu einer Agglutination und Schädigung gewaschener Kaninchenleukozyten. Die Schädigung kommt bei Betrachtung mit der Phasen-

kontrastoptik besonders deutlich zum Ausdruck, indem die Leukozyten allen Glanz und Kontrast verlieren und als matte Schatten erscheinen. Durch unverdünntes oder wenig verdünntes Normalkaninchenplasma wird die leukoagglutinierende Wirkung von Humanserum aufgehoben. Im Gegensatz dazu kommt es mit dem Plasma sensibilisierter Kaninchen unter diesen Bedingungen zu einer wesentlich verstärkten Leukozyten-Agglutination. Ferner entstehen Präzipitate (unlösliche Antigen-Antikörper-Komplexe). In der Humanserumverdünnungsreihe kommt die leukozytenagglutinierende Wirkung durch das Antigen-Antikörper-System deutlich zum Ausdruck, indem hier die Anwesenheit des Kaninchenplasma in der verwendeten Konzentration genügt, um die unspezifische Leukoagglutination durch Humanserum zu verhindern.

Im thrombozytenreichen Plasma der beiden sensibilisierten Kaninchen löste Humanserum bis zu einer Verdünnung von 1:4096 (Nr. 913) bzw. 1:512 (Nr. 977) die Agglutination der Thrombozyten aus.

Tab. 5a

Plasma Nr.	Human- serum- Verdünnung.	Kaninchenplasma-Verdünnungen									phys. NaCl.
		1:2	1:4	1:16	1:64	1:256	1:1024	1:4096	1:16000	1:64000	
913	1:4	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	1:32	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
977	1:4	+++++	+++++	+++	++	++	++	++	++	++	++
	1:32	+++++	+++++	+++	+++	+++	++	++	++	++	++
Kon- trolle	1:4	—	—	+	++	++	++	++	++	++	++
	1:32	—	—	(+)	+	++	++	++	++	++	++

Tab. 5b

Plasma Nr.	Kaninch.- Plasma- Verdünnung.	Humanserum-Verdünnungen								phys. NaCl.
		1:4	1:16	1:64	1:256	1:1024	1:4096	1:16000	1:64000	
913	1:1	+++++	+++++	+++	+++	++	+	—	—	—
	1:4	++	++	++	++	++	(+)	—	—	—
977	1:1	+++	+++	++	++	+	(+)	—	—	—
	1:4	++	++	+	+	(+)	—	—	—	—
Kon- trolle	1:1	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	1:4	(+)	—	—	(+)	—	—	—	—	—
phys. NaCl.		++	++	+	(+)	—	—	—	—	—

Tab. 5: Einwirkung von (Kaninchenplasma + Humanserum) auf Kaninchenleukozyten mit dem Plasma von Kaninchen, die mit Humanserum sensibilisiert worden sind (913, 977) und mit Plasma von unbehandelten Kaninchen (Kontrolle).

a) Kaninchenplasma-Verdünnungsreihe.

b) Humanserum-Verdünnungsreihe.

Plasma Nr.	Humanserum-Verdünnungen				
	1:4	1:16	1:128	1:512	1:4096
913	++++	+++	+++	++	+
977	+++	+++	++	++	—
Kontrolle	—	—	—	—	—

Tab. 6: Einwirkung von Humanserum auf thrombozytenreiches Kaninchenplasma von Kaninchen, die mit Humanserum sensibilisiert worden sind (913, 977) und mit Plasma von Kontrolltieren (Kontrolle).

Diskussion

Am Beispiel von Humanserum als Antigen konnte bestätigt werden, daß klassische Antigen-Antikörper-Reaktionen in Gegenwart von Leukozyten bzw. Thrombozyten zu einer Agglutination dieser Zellen führen können^{15-18, 22}. Von den Versuchen mit chemisch einfachen, nicht eiweißartigen Substanzen gaben einzig die Sensibilisierungsversuche mit Arsphenamin interessante Ergebnisse. Von den 5 mit Arsphenamin sensibilisierten Tieren unterschied sich das Plasma von 3 Kaninchen wohl nicht von demjenigen unbehandelter Tiere. Dagegen gelang es, mit dem Plasma von 2 Tieren (910 und 923) in Gegenwart von Arsphenamin Leukozyten bzw. Thrombozyten spezifisch zu agglutinieren. Eines dieser Seren gab ferner in der nephelometrischen Testung ein positives Resultat.

Mit Pikrylchlorid gelang es dagegen nicht, Tiere so zu sensibilisieren, daß die Reaktion des Immunserums mit Pikrylchlorid zu einer Agglutination von Leukozyten oder Thrombozyten führt.

Im folgenden möchten wir diese Ergebnisse kurz besprechen:

Zunächst müssen wir auf die positive Trübungsreaktion des Serums 910 mit Arsphenamin näher eingehen. Die Eignung dieses nephelometrischen Testes zur Allergendiagnostik wurde nämlich in letzter Zeit stark diskutiert. So gelang es *Kleine* und Mitarbeitern nach monatelangen Versuchen nicht, bei Allergikern das fragliche Allergen mit der nephelometrischen Methode nachzuweisen¹⁰. Blindteste, die in unserem Laboratorium durchgeführt worden sind¹⁹, ergaben, daß der Test kaum zur Allergendiagnostik befähigt ist, indem die Reproduzierbarkeit schlecht ist und der Test infolgedessen in der jetzigen Form zur Routine noch ungeeignet ist. Insbesondere kann ein Resultat mit dieser Methode nur dann verwertet werden, wenn die Reproduzierbarkeit erwiesen ist. Aus diesem Grund testeten wir alle Seren dreimal. — Mit dem Serum aller 4 mit Pikrylchlorid und mit dem Serum von 4 der 5 mit Arsphenamin sensibilisierten Tiere wurden mit einer Ausnahme (Nr. 998) negative Ergebnisse erzielt. Mit dem Serum von Kaninchen 998 wurde einmal eine scheinbar positive Kurve erhalten, die beiden anderen Versuche gaben aber eindeutig negative Ergebnisse, so daß der nephelometrische Test auch für dieses Tier als negativ bewertet wurde. Alle übrigen negativen Kurven waren vom Typus der in Abb. 1 dargestellten, was als eindeutig negativ angesehen wurde. Im Gegensatz

dazu ist die Tatsache bemerkenswert, daß mit dem Serum des Kaninchens Nr. 910 in dreimaliger Wiederholung Kurvenbilder erzielt worden sind, die entweder deutlich oder fraglich positiv erschienen. Es wurde darauf versucht, die Signifikanz dieses Ergebnisses in anderer Versuchsanordnung zu prüfen. Zu diesem Zweck wurden mit dem Eppendorf'schen Photometer die absoluten Trübungswerte des 1:10 verdünnten Serums vor und nach Zugabe eines gleichen Teiles einer Arsphenaminlösung gemessen. Kontrollversuche zeigten, daß die Trübung der Arsphenamin-Serummischung dem nach folgender

Formel errechneten Wert (T^R) weitgehend entspricht: $T^R = \frac{T^S + T^A}{2} \cdot k$, wenn

T^S -Trübung des 1:10 verdünnten Serums und T^A -Trübung der Arsphenaminlösung ist. Die Serumverdünnung von 1:10 war notwendig, um unspezifische Reaktionen einerseits zwischen Serum und dem differenten Arsphenamin, andererseits zwischen Serum und destilliertem Wasser zu verhindern. Das Ergebnis aus dieser Versuchsanordnung zeigte nun tatsächlich, daß die Trübungswerte wesentlich über dem mit H_2O errechneten Wert lagen, wenn das Serum 910 verwendet wurde (Abb. 2). Auf Grund dieses Ergebnisses gewinnt der Ausfall des nephelometrischen Testes nach der *Hoigné'schen* Versuchsanordnung an Signifikanz und damit bekommen auch die mit dem Serum 910 erzielten Thrombo- und Leukoagglutinationen mehr Bedeutung.

In den *Agglutinationsversuchen* war nämlich wiederum das Plasma des Tieres 910 am aktivsten: im thrombozytenreichen Plasma dieses Kaninchens wurden die Thrombozyten durch Zusatz von Arsphenamin bis zu einer Arsphenaminverdünnung von 1:256 (einer 0,01%igen Lösung) zur Agglutination gebracht. Ferner wurden Leukozyten eines normalen Kaninchens durch dieses Plasma in Gegenwart von Arsphenamin wesentlich stärker als durch das Plasma unbehandelter Kaninchen agglutiniert. — Aktiv hinsichtlich der Thrombo- und Leukoagglutination war ferner, wenn auch etwas weniger stark, das Plasma des Tieres 923.

Aus diesen Versuchen darf also geschlossen werden, daß die Sensibilisierung mit Arsphenamin bei einem Tier (910) sicher und bei einem zweiten Tier wahrscheinlich gelungen ist, und daß die Reaktion des Immunserums mit dem Allergen (Arsphenamin) in Gegenwart von Leukozyten und Thrombozyten zu einer Agglutination dieser Zellen führen kann.

Damit kommen wir zur Besprechung der Ergebnisse im Zusammenhang mit den Seroreaktionen, die im Falle von medikamentöser allergischer Thrombopenie und Agranulozytose beobachtet werden. Zunächst ist von Interesse, daß analoge Reaktionen nicht nur mit klassischen Antigen-Antikörper-Reaktionen mit einem Eiweiß als Antigen, sondern auch mit chemisch einfachen Stoffen als Allergen möglich sind. Letztere Reaktionen kommen denjenigen, die bei allergischer medikamentöser Thrombopenie und Agranulozytose beobachtet werden, wesentlich näher.

Wie kann nun der Mechanismus der Thrombo- und Leukoagglutination durch diese einfachen chemischen Substanzen als Allergen gedeutet werden? Wir haben schon erwähnt, daß eine Auffassung in der Annahme besteht, daß sich das

Allergen (Medikament) an diejenige Zelle zur Bildung eines »Vollantigens« anlagert, die im Falle der allergischen klinischen Reaktionen in Mitleidenschaft gezogen wird, und daß die gebildeten Antikörper nicht nur eine Medikament-Spezifität, sondern auch eine Zellspezifität aufweisen. Arsphenamin stellt nun eine Substanz dar, die sich sehr leicht an alle Proteine anlagert. Es erscheint aber unwahrscheinlich, daß der Organismus nun gegen all diese Proteine in Verbindung mit Arsphenamin Antikörper produziere. Das Ergebnis des nephelometrischen Testes deutet vielmehr darauf hin, daß das Immunsrum mit Arsphenamin ohne die Gegenwart von Zellen spezifisch reagieren kann. Damit kommen wir zur zweiten Hypothese des Mechanismus der Agglutination von Thrombozyten und Leukozyten in Gegenwart eines Allergens und dessen korrespondierenden Immunsrums: Wir nehmen an, daß die Agglutination ein sekundäres Phänomen, d. h. eine Begleiterscheinung und nicht die eigentliche Immunreaktion ist. Es würde sich dabei um einen der passiven Hämagglutination analogen Vorgang handeln, wo die Erythrozyten nur als Träger eines Antigens von der Immunreaktion betroffen werden, und zwar eines Antigens, das sekundär an das rote Blutkörperchen angelagert worden ist. Die Tatsache, daß analoge Reaktionen mit Eiweiß als Antigen (Humansrum) und mit chemisch einfachen Allergenen (z. B. Arsphenamin) beobachtet werden, scheint uns für diese zweite Hypothese zu sprechen, da kein Grund zur Annahme besteht, daß es sich hier um zwei prinzipiell verschiedene Phänomene handelt. Für die Leuko- und Thromboagglutination durch Immunreaktionen mit Eiweiß als Antigen konnte der Nachweis erbracht werden, daß sich Antigen-Antikörper-Komplexe auf diese Zellen anlagern und so deren Agglutination bewirken können^{16, 22}, wodurch diese Reaktion eben in Analogie zur »passiven Hämagglutination« gestellt werden kann. Wir vermuten deshalb, daß es sich auch bei den Zellagglutinationen mit Arsphenamin als Allergen um ein der passiven Hämagglutination analoges Phänomen handle. Es sei aber betont, daß es anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht möglich ist zu beweisen, was nun tatsächlich der Mechanismus der Zellagglutination ist.

Im Rahmen der hier besprochenen Versuche erscheint also allein die Tatsache, daß mit chemisch einfachen Stoffen als Allergen leukozyten- und thrombozytenagglutinierende Phänomene ausgelöst werden können, von Bedeutung. Dies gestattet, im Tierexperiment den in der Klinik gelegentlich beobachteten Seroreaktionen analoge Phänomene zu reproduzieren und eröffnet damit neue Möglichkeiten, den Mechanismus dieser Reaktionen weiter zu differenzieren.

Zammenfassung

Am Beispiel von Humansrum als Antigen konnte bestätigt werden, daß klassische Antigen-Antikörper-Reaktionen in Gegenwart von Leukozyten bzw. Thrombozyten zu einer Agglutination dieser Zellen führen können. Von den Versuchen mit chemisch einfachen, nicht eiweißartigen Substanzen (Arsphenamin, Pikrylchlorid) gaben einzig die Sensibilisierungsversuche mit Arsphenamin positive Ergebnisse. Von 5 mit Arsphenamin sensibilisierten Tieren gelang es, mit dem Plasma von 2 Tieren Leukozyten bzw. Thrombozyten in Gegen-

wart von Arsphenamin spezifisch zu agglutinieren. Eines dieser Seren gab ferner in der nephelometrischen Testung ein positives Resultat.

Die Ergebnisse wurden im Zusammenhang mit den Seroreaktionen, die im Falle von medikamentöser allergischer Thrombopenie und Agranulozytose beobachtet werden, besprochen.

Literatur: 1 Adkroyd J. F.: Clin. Sci. 7, 249 (1948). — 2 Adkroyd J. F.: Clin. Sci. 8, 235 (1949). — 3 Adkroyd J. F.: Clin. Sci. 8, 269 (1949). — 4 Adkroyd J. F.: Clin. Sci. 10, 185 (1951). — 5 Bigelow F. S. a. Desforges J. F.: Amer. J. Med. Sci. 224, 274 (1952). — 6 Bolton E. T. a. Young R. V.: J. Clin. Path. 6, 320 (1953). — 7 Frei W.: J. Invest. Dermat. 5, 29 (1942). — 8 Hoigné R., Grossmann W. u. Stork H.: Schweiz. med. Wschr. 578 (1955). — 9 Kerr Grant D.: Brit. Med. J. 2, 128 (1953). — 10 Kleine N., Matthes M. u. Müller W.: Klin. Wschr. 35, 132 (1957). — 11 Landsteiner K. u. Jacobs J.: J. Exp. Med. 64, 717 (1936). — 12 Landsteiner K. u. Jacobs J.: J. Exp. Med. 61, 643 (1935). — 13 Larson R. K.: Blood 8, 16 (1953). — 14 Miescher P.: Exp. Inn. Med. u. Kinderheilk. 7, 170 (1956). — 15 Miescher P. u. Miescher A.: Schw. med. Wschr. 1279 (1952). — 16 Miescher P. u. Straessle R.: Vox Sanguinis 1, 83 (1956). — 17 Miescher P., Straessle R. u. Neukomm S.: Helv. med. Acta 21, 392 (1954). — 18 Miescher P., Straessle R. u. Miescher A.: Sang 26, 76 (1955). — 19 Miescher P. u. Vorlaender K. O.: Immunopathologie in Klinik und Forschung. Georg Thieme-Verlag, Stuttgart 1957. — 20 Moeschlin S. u. Wagner K.: Acta haemat. 8, 29 (1952). — 21 Moeschlin S.: Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 60, 253 (1954). — 22 Straessle R. u. Miescher P.: Schw. med. Wschr. 86, 1461 (1956).

Anshr. d. Verf.: Dr. A. Pearl, Basel (Schweiz), Med. Poliklinik der Universität.

